

LIPIDGEHALT ISOLIERTER MENSCHLICHER
LEUKOZYTEN BEI NORMALPERSONEN
UND PATIENTEN MIT HÄMOBLASTOSEN

CHRISTINE MORELL

1971



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41553801_0066

Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München

Direktor: Prof. Dr. H. Schwiegk

Lipidgehalt isolierter menschlicher Leukozyten bei
Normalpersonen und Patienten mit Hämoblastosen.

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig- Maximilians- Universität zu München

vorgelegt von

Christine Morell

aus Freudenberg/ Westfalen

München 1971

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. P. Schwandt

Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Schwiegk

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 2.12.1971



Lipidgehalt isolierter menschlicher Leukozyten bei
Normalpersonen und Patienten mit Hämoblastosen

I. Einleitung

Lipidgehalt in normalen und pathologischen Leukozyten.

II. Fragestellung

III. Methodik

1. Patienten

2. Untersuchungsmethoden

a) Quantitative Lipidbestimmung

b) selektive cytochemische Lipidbestimmung

IV. Ergebnisse

1. Quantitative Lipidbestimmung

2. Selektive cytochemische Lipidbestimmung

3. Lipidbestimmung in Erythrozyten

4. Gesamtlipide im Serum

V. Diskussion

1. Methodik

2. Ergebnisse

VI. Zusammenfassung

VII. Literaturangaben

I. Einleitung

Lipidgehalt in normalen und pathologischen Leukozyten

Über den Kohlehydrat- und Proteinstoffwechsel normaler und pathologischer Leukozyten sind in den letzten Jahrzehnten zahlreiche Arbeiten veröffentlicht worden, darunter neuere Übersichtsarbeiten von CLINE ¹¹ (1965), ALEKSANDROWICZ ¹ (1965) und LÖHR ²⁶ (1961). Über den Lipidstoffwechsel und die quantitative Lipidzusammensetzung der Leukozyten liegen nur wenige Untersuchungen vor, deren Ergebnisse nur z. T. übereinstimmen.

Im allgemeinen wurden zwei Grundmethoden angewandt, um den Lipidgehalt der Leukozyten zu bestimmen:

Die erste Methode ist die selektive cytochemische Lokalisation der Lipide. Nachdem LISON ²⁵ 1934 das Sudanschwarz B als " Fettfarbstoff mit der größten Färbbreite " (CLARA ¹⁰) eingeführt hatte, gab SHEEHAN ³⁴ 1939 ein Verfahren zur Färbbarkeit der Leukozyten mit Sudanschwarz B an. Dieses Verfahren wurde inzwischen mehrfach (SHEEHAN - STOREY ³⁵ (1947), BAILLIFF - KIMBROUGH ² (1947), HAYHOE ¹⁸ (1953) und STORTI - PERUGINI ³⁷ (1951)) zu einer Methode modifiziert, die morphologische Studien der Lipidverteilung in Blut- und Knochenmarkselementen erlaubt.

In den normalen Zellen der myeloischen Reihe zeigen die Myeloblasten bei Färbung mit Sudanschwarz B nur eine schwache Reaktion, die Promyelozyten geben schon eine deutliche Fettreaktion, die mit zunehmendem Reifungsgrad an Intensität zunimmt und ihr Maximum in den ausgereiften Granulozyten erreicht. (WISLOCKI - DEMPSEY ³⁸, BAILIFF-KIMBROUGH ², STORTI-PERUGINI ³⁷, POLLI-RATTI ³⁰, BLOOM-WISLOCKI ⁴, HAYHOE ¹⁸, HERTL ¹⁹ und LAMBERS - EGGSTEIN ²⁴)

Einen hohen Gehalt an Lipiden weisen hierbei die Granula und die Mitochondrien - davon besonders die jeweiligen Membranen - auf. In den Mitochondrien bilden die Lipide die etwa 50 Å breite Mittelschicht der Protein - Lipid - Doppelschicht. Auch in den Septen der Mitochondrien wurden Lipide gefunden.

Der Lipidgehalt der Mitochondrien beträgt etwa 35 % des Gesamttrockengewichts, den Hauptanteil davon bilden die Phospholipide. (BESSIS ³, RAPAPORT ³²)

Die eosinophilen und die basophilen Granulozyten zeigen, ebenso wie die Neutrophilen, eine ausgeprägte Sudanophilie ihres Zytoplasmas.

Normale Lymphozyten enthalten in der Regel keine sudanpositiven Substanzen (WISLOCKI - DEMPSEY ³⁸, BAILIFF - KIMBROUGH ², STORTI - PERUGINI ³⁷, LAMBERS - EGGSTEIN ²⁴, HAYHOE ¹⁸, BLOOM - WISLOCKI ⁴). Nur HERTL ¹⁹ konnte nach langen Färbezeiten eine schwache, diffus- bis feinstgranuläre

Färbung der normalen Lymphozyten mit Sudanschwarz B nachweisen. BLOOM - WISLOCKI ⁴ beschreiben bisher als einzige eine Sudanophilie normaler Lymphoblasten.

Der Fettgehalt der Monozyten wurde übereinstimmend von fast allen Autoren als wechselnd sudanophob bis schwach sudanophil beschrieben.

Bei infektiösen Prozessen beschrieben STORTI - PERUGINI ³⁷ eine Verminderung des Fettgehaltes der Granulozyten; LAMBERS und EGGSTEIN ²⁴ konnten diese Befunde nicht bestätigen. Beide Autoren wendeten die gleiche Färbemethode an.

Durch zytochemische Untersuchungen bei chronischen Lymphadenosen konnten STORTI - PERUGINI ³⁷ und HAYHOE ¹⁸ keinen unterschiedlichen Lipidgehalt zu den Lymphozyten von Gesunden feststellen. HAYHOE beschreibt jedoch, daß sich die Lymphoblasten bei der chronischen Lymphadenose schwach anfärben.

Bei Untersuchungen an 4 chronischen Myelosen fanden LAMBERS und EGGSTEIN ²⁴ eine Verminderung des Fettgehaltes der neutrophilen Granulozyten. STORTI - PERUGINI ³⁷ fanden in 3 von 5 Fällen eine Verminderung des Fettgehaltes der reifen Granulozyten. HAYHOE ¹⁸ fand, daß in allen Reifestadien kein Unterschied bestand zwischen Leukozyten bei chronischen Myelosen und normalen Zellen.

STORTI - PERUGINI ³⁷ stellten bei akuten Leukosen eine Diskrepanz zwischen morphologischen und histochemischen Befunden fest : Zellen, die morphologisch als Stammzellen und Paramyeloblasten identifiziert wurden, zeigten bei der Färbung mit Sudanschwarz B ein Verhalten, das dem von

Promyelozyten bzw. Myelozyten entsprach. Nach Ansicht der Autoren sind die Zellen, die bei akuten Leukosen auftreten, in ihrer morphologischen und chemischen Struktur so schwer verändert, daß sie - mit üblichen Färbemethoden wie May-Grünwald-Giemsa u. ä. untersucht - Stammzellen oder Paramyeloblasten ähneln können, obwohl sie zu den Promyelozyten oder den Myelozyten gehören und auch deren Verhalten bei der Sudanfärbung zeigen.

Um die akuten Leukosen besser differenzieren zu können, schlagen die Autoren deshalb bei derartigen Krankheitsbildern vor, die Blutaussstriche nicht nur mit den üblichen Färbemethoden zu untersuchen, sondern zusätzlich die Peroxydase-Reaktion sowie die Färbung mit Sudanschwarz B durchzuführen. LAMBERS - EGGSTEIN²⁴ fanden bei 4 Fällen von insgesamt 19 Paramyeloblastenleukämien sudanpositive Granula in den Paramyeloblasten.

Die zweite Methode zur Untersuchung des Lipidgehaltes der Leukozyten ist die quantitative Bestimmung. Die ersten ausführlichen Untersuchungen darüber fanden wir bei BOYD⁵ (1933). Er gab den Lipidgehalt in Leukozyten junger, gesunder Frauen mit 1 - 3 % des Frischgewichtes der Leukozyten an. In einer weiteren Arbeit untersuchte BOYD⁶ die Lipidzusammensetzung leukämischer Leukozyten. Er fand bei einem Kollektiv von 8 Fällen chronischer Lymphadenosen und 9 Fällen chronischer Myelosen signifikante Unterschiede zwischen beiden Leukämieformen. Bei der chronischen Myelose waren

durchweg erhöhte Gesamtlipidwerte zu finden, bei der chronischen Lymphadenose dagegen war der Gesamtlipidgehalt der Leukozyten erniedrigt. BOYD führte diese Beobachtungen zum großen Teil auf die jeweiligen unterschiedlichen Anteile der einzelnen Leukozytentypen im Blut zurück, nicht auf einen pathologischen veränderten Stoffwechsel.

Mit diesem Problem befaßte er sich in einer weiteren Arbeit (BOYD ⁷). Er verglich die Lipidzusammensetzung der Leukozyten von Normalpersonen mit dem Differentialblutbild und fand proportional der prozentualen Zunahme der neutrophilen Segmentkernigen einen Anstieg der Phospholipide und des freien Cholesterins. Andere Lipidfraktionen zeigten keine Korrelationen mit dem Differentialblutbild.

ELSBACH ¹⁴ (1959) berichtete über die Lipidzusammensetzung von Kaninchenleukozyten während Phagozytose und Ruhephasen. Er fand keinen Unterschied im Lipidgehalt, beschrieb aber während der Phagozytose eine gesteigerte Lipidsynthese, die hauptsächlich Triglyzeride und Cholesterin betraf.

Bei Inkubation von Blut mit C^{14} - Azetat werden Lipide synthetisiert. Diese Synthese geschieht hauptsächlich in den Leukozyten ; diese sind 100 bis 1000 mal aktiver als Erythrozyten und Thrombozyten. Die gebildeten Lipide werden mit dem Plasma ausgetauscht. (ROWE, ALLISON und LOVELOCK ³³, BUCHANAN ⁹, MARKS und GELLHORN ²⁹, KIDSON ²³).

KIDSON ²³ verglich den Lipidstoffwechsel der Leukozyten mit dem Reifegrad der Zellen. Bei infektabingter Leukozytose fand er eine erniedrigte Einbaurrate von C^{14} - Azetat in

die Leukozytenlipide. Die niedrigste Syntheserate stellte er bei den Fällen mit dem größten Prozentsatz stabkerniger Granulozyten fest. In einer weiteren Arbeit über den Stoffwechsel der Leukozyten bei myeloproliferativen Krankheitsbildern ²¹ konnte er die obengenannten Befunde bestätigen. Er fand bei Patienten mit Polycythämia vera, die relativ viele junge Zellen der myeloischen Reihe aufweist, eine erniedrigte Lipidsynthese. Die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Lipidfraktionen war jedoch normal. Bei akuten myeloischen Leukämien (KIDSON ²²) war die Lipidsynthese signifikant erhöht, bei akuten lymphatischen Leukämien stark erniedrigt. Die Verteilung der Radioaktivität auf die einzelnen Lipidfraktionen entsprach der bei Normalpersonen; eine Ausnahme bilden die erhöhten Phospholipide bei akuter myeloischer Leukämie. Auch MALAMOS et al. ²⁸ fanden bei myeloischen und lymphatischen Leukämien einen erhöhten prozentualen Anteil der Radioaktivität bei Phospholipiden nach Inkubation mit C¹⁴ - Azetat. GOTTFRIED ¹⁷(1967) trennte Lymphozyten und Granulozyten mit Hilfe von Glasperlensäulen nach RABINOWITZ ³¹. Mit dieser Methode gelang es ihm, den Lipidgehalt einzelner Leukozyten weitgehend frei von Verunreinigungen durch andere Leukozyten zu bestimmen. Er trennte Lymphozyten und segmentkernige Leukozyten von Normalpersonen in Fraktionen, die durchschnittlich 98 % der spezifischen Zellen enthielten. Weiter untersuchte er Lymphozyten und Lymphoblasten von Patienten mit chronischer Lymphadenose sowie reife und unreife Zellen von

Patienten mit chronischer Myelose. Er gab den Gesamtlipidgehalt von Leukozyten gesunder Versuchspersonen mit gemischter Leukozytenpopulation mit $15,5 \text{ g} \times 10^{-12}$ Zellen an. Der Gesamtlipidgehalt von Lymphozyten bei chronischen Lymphadenosen lag mit $5,44 \text{ g} \times 10^{-12}$ Zellen wesentlich niedriger. Auch der Gesamtlipidgehalt chronischer Myelosen lag mit durchschnittlich $13,4 \text{ g} \times 10^{-12}$ Zellen niedriger als bei normalen Leukozyten.

II. Fragestellung

In der Literatur besteht eine erhebliche Divergenz der quantitativen Angaben über die Lipidzusammensetzung in Leukozyten von Normalpersonen, chronischen Lymphadenosen und chronischen Myelosen. Über den Lipidstoffwechsel der Leukozyten liegen insgesamt nur wenige Untersuchungen vor, die zudem wegen unterschiedlich gewählter Bezugsgrößen schwer vergleichbar sind. Ein Großteil der auf diesem Gebiet durchgeführten Arbeiten sind älteren Datums und liegen z. T. schon über 30 Jahre zurück.

Inzwischen stehen uns aber wesentlich verbesserte Methoden zur Verfügung. Es schien uns interessant, die Lipidzusammensetzung der Leukozyten mit diesen verbesserten Methoden zu untersuchen. Insbesondere wendeten wir eine neue Isolations-technik an: Die Leukozytenisolierung erfolgte nach einer von FHRHART und DÖRFLER ¹³ (1964) angegebenen neuen Methode, die es ermöglicht, morphologisch unversehrte, funktionstüchtige Leukozyten ohne Zusätze von Fremdsubstanzen (Dextran, EDTA u. dgl.) isolieren zu können.

Durch unsere Untersuchungen sollte ein Ausgangspunkt für spätere Untersuchungen über Therapieeinflüsse auf den Lipidgehalt der Leukozyten geschaffen werden. Ferner sollte festgestellt werden, ob Beziehungen zu den Serumlipidwerten vorhanden sind bzw. inwieweit ein Austausch zwischen Serumlipiden und Leukozytenlipiden erfolgt.

Durch gleichzeitig durchgeführte quantitative biochemische Analysen und zytochemische Untersuchungen sollte festgestellt werden, ob Diskrepanzen zwischen beiden Befunden bestehen und wodurch diese ggf. erklärt werden können.

III. Methodik

1. Patienten

In dieser Arbeit wurden die Lipidwerte isolierter Leukozyten von Normalpersonen mit denen leukämischer Leukozyten verglichen. Untersucht wurden 11 Normalpersonen und 29 teils stationäre, teils ambulante Patienten mit Hämoblastosen der I. Medizinischen Universitätsklinik München. Dabei handelte es sich um 14 Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie, 10 Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie und 5 Patienten mit akuter Myeloblastenleukämie. In allen Fällen lagen neu diagnostizierte, unbehandelte Hämoblastosen mit normalen Serumlipidwerten vor.

Gleichzeitig wurde an 4 Patienten mit chronischer Myelose und an 10 Patienten mit chronischer Lymphadenose der Lipidgehalt der Leukozyten zum Vergleich durch cytochemische Untersuchung bestimmt.

2. Untersuchungsmethoden

a) Quantitative Lipidbestimmung

Die quantitative Lipidbestimmung in Leukozyten aus menschlichem peripherem Blut erfordert ein sehr sorgfältiges Verfahren zur Leukozytenisolierung. Die gewonnenen Leukozyten sollen möglichst frei von störenden anderen Blutzellen sein und morphologisch wie funktionell möglichst intakt sein.

Die von FHRHART und DÖRFLER ¹³ angegebene Methode zur Leukozytenisolierung, die ohne Zusatz von Fremdsubstanzen durchgeführt wird, erfüllt diese Anforderungen.

aa) Leukozytenisolierung

60 - 120 ml Venenblut werden in einer silikonisierten Spritze aufgezogen. Bei der Blutentnahme wird langsam und ohne Schaumbildung mit wenig Heparin im toten Raum der Spritze aspiriert und dieses mit dem entnommenen Blut gut vermischt. Nach Abnahme des Zylinderaufsatzes des für diesen Zweck konstruierten Isoliergerätes wird das Blut dem im unteren Teil des eisgekühlten Isoliergerätes befindlichen Quecksilber aufgeschichtet, verschlossen und in einer Kühlzentrifuge (Fa. Christ, Universal Junior III KS) konstant bei $+ 8^{\circ}$ bis $+ 10^{\circ}$ C und einer Tourenzahl von 800 U/min (d. entspricht 1600 g) zentrifugiert. Bei größeren Blutmengen empfiehlt sich der Einsatz eines Kunststoffkreuzes in das Isoliergerät. Es soll die Verquirlung der verschiedenen Blutzellschichten beim Abbremsen der Zentrifuge verhindern. Um ein gutes Absetzen der Leukozytenschicht auf die darunter befindlichen Erythrozyten im Druckrohr zu erzielen, genügt eine Zentrifugierzeit von höchstens 20 Minuten. Anschließend wird das Zentrifugenglas mit dem Hg- Behälter verbunden und so langsam angehoben, daß auch der Quecksilberstempel im inneren Gefäß zu steigen beginnt. Der Dichteskala entsprechend

schieben sich die einzelnen Blutzellfraktionen zunächst im Zylinderanteil, dann im kapillären Anteil hoch, fließen schließlich aus der Kapillare aus und können als Tropfen aufgefangen werden. Die der Plasma - Thrombozytenschicht folgende Leukozytenschicht wird aufgefangen und mit der Analysenwaage (Typ Mettler) abgewogen. Danach wird die Leukozytensuspension zweimal mit 25 ml physiologischer Kochsalzlösung gewaschen ; das entspricht etwa einem Verhältnis von 1 : 25. Dabei wird jeweils 10 min in der Kühlzentrifuge zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Das so vom Plasma weitgehend gereinigte Leukozytenkonzentrat wird mit physiologischer Kochsalzlösung auf das ursprüngliche Gewicht verdünnt. Die weitere Verarbeitung der Leukozyten wird bei Zimmertemperatur durchgeführt.

bb) Zellaufbereitung und Lipidbestimmung

Die isolierten, gewaschenen Leukozyten werden vorsichtig aufgeschüttelt, der Zellgehalt $/\text{mm}^3$ mit dem Zellzählgerät " Coulter Counter " bestimmt und zum Ausschluß des Erythrozytenfehlers die in der Leukozytensuspension mitenthaltenen Erythrozyten $/\text{mm}^3$ ausgezählt. Die Berücksichtigung des Erythrozytenfehlers wird später beschrieben. Thrombozyten sind in der Leukozytenschicht nicht enthalten.

Die isolierten Zellen werden 15 sec mit dem Ultra Turrax Typ TP 18/2 bei 24 000 U/sec homogenisiert. Vor und nach

dem Homogenisieren wird die Leukozytensuspension mit der Analysenwaage gewogen, um den dadurch entstandenen Verlust zu berechnen.

Die isolierten Erythrozyten werden zu gleichen Teilen mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und der Zellgehalt pro mm^3 bestimmt. Dann werden die Erythrozyten wie oben beschrieben im Ultra Turrax bei 24000 U/sec zerschlagen und wie die Leukozyten weiter verarbeitet.

Als für die Lipidbestimmung am günstigsten haben sich Konzentrationen von mindestens 0,1 bis 0,5 Milliarden Zellen/ml erwiesen. Zur Bestimmung weniger konzentrierter Proben reichte die Empfindlichkeit der Methode nicht aus.

Die Lipidextraktion erfolgte sofort nach dem Homogenisieren mit einem 2:1 Äthanol:Äther - Gemisch im Verhältnis 25:1 nach den Angaben von KATSURA et al.²⁰. Im Lipidextrakt bestimmten wir die Esterfettsäuren nach EGGSTEIN¹², den Lipidphosphor nach FISKE u. SUBARROW¹⁵, das Cholesterin nach SPERRY und WEBB³⁶, die Gesamtlipide nach ZÖLLNER und KIRSCH⁴⁰. Verwandt wurde das Mikrolitersystem der Firma Eppendorf.

Die photometrischen Messungen wurden mit dem Spektrophotometer, Modell DU, der Fa. Beckmann und dem Photometer Modell 1100 M der Fa. Eppendorf durchgeführt.

cc) Berechnung

Die in mg/ml Leukozytenhomogenat erhaltenen Lipidwerte wurden nach der folgenden Formel auf $\text{mg}/10^9$ Zellen umgerechnet:

$$F_L = \frac{F_{L \text{ dir. (mg/ml)}}}{L \text{ (millard/ml)}} - \frac{F_E \text{ (mg/ml)} \times E_{\text{in L}} \text{ (millard/ml)}}{E_{\text{in E}} \text{ (millard/ml)}}$$

Dabei bedeuten:

- F_L = Fettwert in $\text{mg}/10^9$ Leukozyten
 $F_{L \text{ dir.}}$ = Fettwert in mg/ml der Leukozytensuspension
 L = Zahl der Leukozyten in der Leukozytensuspension
 F_E = Fettwert d. Erythrozyten in der Erythrozytensuspension
 $E_{\text{in L}}$ = Zahl der Erythrozyten in der Leukozytensuspension
 $E_{\text{in E}}$ = Zahl der Erythrozyten in der Erythrozytensuspension

Die statistischen Angaben wurden mit der Olivetti - Rechenmaschine erbracht. Bei den quantitativen Lipidbestimmungen in Leukozyten und Erythrozyten wurden die Mittelwerte ($\bar{x}$) der einzelnen Lipidfraktionen, nach der Formel

$$s = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

die daraus errechneten Standardabweichungen (s_x) und die nach dem Student - Test ermittelten Wahrscheinlichkeiten (p) berechnet.

b) Selektive cytochemische Lipidbestimmung

Die selektive cytochemische Lipidbestimmung wurde simultan zur quantitativen durchgeführt.

Unserer Bestimmung lag das Verfahren von SHEEHAN ³⁴, modifiziert nach SHEEHAN u. STOREY ³⁵ zu Grunde.

Verwendet wurden luftgetrocknete Ausstriche von isolierten Leukozyten, die durch die oben beschriebene Isolierungsmethode gewonnen wurden.

Arbeitsgang : Die Ausstriche wurden 10 min lang über dem Dampf von 40 %igem Formalin in einem geschlossenen Gefäß fixiert. Danach wurden sie 20 min lang mit Sudanschwarz B-Pufferlösung gefärbt. Anschließend wurden sie gut mit 70 %igem Alkohol abgespült, danach mit Aqua dest. gespült. Nun erfolgte die Gegenfärbung mit Kernechtrot über eine Zeit von 10 min. Um die Zelltypen genau differenzieren zu können, wurde von jedem dieser Ausstriche ein weiteres Präparat nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt.

Auswertung der Präparate :

Je nach Farbintensität und Anzahl der Lipidgranula wurden die Zellen folgenden Stufen zugeordnet :

- 0 = keine Lipidgranula
- 1 = wenige (etwa 5 - 10) Lipidgranula
- 2 = einzelne Gruppen von Granula
- 3 = viele Granula, jedoch noch fein und " staubig "
- 4 = dichtliegende, tiefschwarze Granula

IV. Ergebnisse

1. Quantitative Lipidbestimmung

Die nachfolgenden tabellarischen Zusammenstellungen geben die in normalen und leukämischen Leukozyten gefundenen Mittelwerte der untersuchten Lipidfraktionen mit den Standardabweichungen (s) und den nach dem Student - Test ermittelten Wahrscheinlichkeiten (p) wieder.

Zur näheren Charakterisierung der Hämoblastosen vom Typ der chronischen Lymphadenosen, chronischen Myelosen und akuten Leukämien werden die Mittelwerte der peripheren Leukozytenzahlen und Prozentzahlen der unreifzelligen und reifzelligen Granulozyten und Lymphozyten im Leukozytenkonzentrat angegeben. (Tab. 1)

Tab. 1 : Mittelwerte ($\bar{x}$) der peripheren Leukozytenzahlen und Prozentzahlen der unreifzelligen und reifzelligen Granulozyten und Lymphozyten im Leukozytenkonzentrat.

Zelltyp	periphere Zellzahl($\bar{x}$)	unreifer Zellanteil i. %	reifer Zellanteil	Lympho- zyten
chr. Myelose	102 570	31	67	2,2
akute Myelose	92 360	81	19	--
chr. Lymph- adenose	67600	—	7,1	78

Bei den chronischen Myelosen fand sich eine durchschnittliche Zellzahl von 102 570 mit 31 % unreifzelligen (Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten) und 67 % reifzelligen (Meta-myelozyten, Stabkernige und Segmentkernige) Granulozyten sowie 2,2 % Lymphozyten. Die akuten Myelosen zeigten bei 92 360 Leukozyten 81 % unreifzellige (Paramyeloblasten, Paraleukoblasten) und 19 % reifzellige Granulozyten. Die chronischen Lymphadenosen waren durch 67 600 Leukozyten gekennzeichnet, wovon 7,1 % reifzellige Granulozyten und 78 % Lymphozyten waren.

Die Gesamtlipide waren bei den 11 Normalfällen mit $15,56 \text{ mg}/10^9$ Zellen signifikant höher als bei den 10 chronischen Myelosen ($10,37 \text{ mg}/10^9$ Zellen) und den 14 chronischen Lymphadenosen ($5,49 \text{ mg}/10^9$ Zellen). Es besteht somit ein annähernd ganzzahliges Verhältnis von 1 : 2 : 3 zwischen Lymphadenose : Myelose : Normal. (Tab. 2)

Die Unterschiede zwischen akuter Myeloblastenleukämie einerseits und chronischer myeloischer Leukämie bzw. Normalfällen andererseits waren nicht signifikant.

Der prozentuale Gehalt an freiem Cholesterin war mit 11 - 17 % der Gesamtlipide bei den einzelnen Gruppen annähernd gleich. Signifikant verschiedene Absolutwerte fanden sich zwischen dem Normalkollektiv ($2,32 \text{ mg}/10^9$ Zellen) und den chronischen lymphatischen Leukämien ($0,96 \text{ mg}/10^9$ Zellen). Bei den Normalfällen und den akuten Myeloblastenleukämien

bestanden nur sehr geringe Unterschiede zwischen dem Gesamtcholesterin ($2,83 \text{ mg}/10^9$ Zellen bzw. $1,69 \text{ mg}/10^9$ Zellen) und dem freien Cholesterin ($2,32 \text{ mg}/10^9$ Zellen bzw. $1,48 \text{ mg}/10^9$ Zellen): bei den chronischen Myelosen und chronischen Lymphadenosen ließ sich kein verestertes Cholesterin nachweisen. Wir haben deshalb auf eine tabellarische Wiedergabe der Gesamtcholesterinwerte verzichtet. (Tab. 3)

Die als Lezithin berechneten Phospholipide stellen schon bei den Normalfällen mit $2/3$ den Hauptanteil der Gesamtlipide; bei den akuten Myeloblastenleukämien machen sie $3/4$ der Gesamtlipide aus, erreichen bei den chronischen Myelosen 83% und bei den chronischen Lymphadenosen 100% der Gesamtlipide. Bei diesen Prozentangaben ist zu berücksichtigen, daß keine einheitlichen Leukozytenpopulationen untersucht, die Standardabweichung bei dieser Rechnung nicht berücksichtigt und alle Werte auf Lezithin bezogen wurden. Untersuchungen über die Zusammensetzung der Phospholipide haben wir nicht durchgeführt. (Tab. 4)

Das für die Gesamtlipide angegebene Zahlenverhältnis gilt in etwa auch bei den Esterfettsäuren ($2,85 : 4,62 : 6,48 \text{ mg}/10^9$ Zellen). Mit $7,40 \text{ mg}/10^9$ Zellen liegen die veresterten Fettsäuren bei den akuten Myeloblastenleukämien am höchsten innerhalb der vier Kollektive. (Tab. 5)

Tab. 2 : Gesamtlipide in Leukozyten von Normalpersonen (Norm), chronischen myeloischen Leukämien (CML), chronischen lymphatischen Leukämien (CLL) und akuten Leukämien (Akut), angegeben in $\text{mg}/10^9$ Zellen.

Typ	Zahl d. Pat. (n)	Mittelwert ($\bar{x}$)	Standardab- weichung (s_x)	Vergleich mit	p
Normal	11	15,56	3,06	CML	< 0,0005
				CLL	< 0,0005
				Akut	< 0,15
CML	10	10,37	1,49	Norm	< 0,0005
				CLL	< 0,0005
				Akut	< 0,05
CLL	14	5,49	1,72	Norm	< 0,0005
				CML	< 0,0005
				Akut	< 0,0005
Akut	5	13,35	4,88	Norm	< 0,15
				CML	< 0,05
				CLL	< 0,0005

Tab. 3 : Freies Cholesterin in Leukozyten von Normalpersonen, chronischen myeloischen Leukämien, chronischen lymphatischen Leukämien, akuten Leukämien, angegeben in $\text{mg}/10^9$ Zellen.

Typ	Zahl d. Pat. (n)	Mittelwert ($\bar{x}$)	Standardab- weichg. (s_x)	Vergleich mit	p
Normal	10	2,32	0,79	CML	< 0,025
				CLL	< 0,0025
				Akut	< 0,05
CML	4	1,35	0,33	Norm	< 0,025
				CLL	< 0,10
				Akut	< 0,40
CLL	5	0,96	0,40	Norm	< 0,0025
				CML	< 0,10
				Akut	< 0,10
Akut	5	1,48	0,65	Norm	< 0,05
				CML	< 0,40
				CLL	< 0,10

Tab. 4 : Lipidphosphor in Leukozyten von Normalpersonen, chronischen myeloischen Leukämien, chronischen lymphatischen Leukämien und akuten Leukämien, angegeben in $\text{mg}/10^9$ Zellen.

Typ	Zahl d. Pat. (n)	Mittelwert ($\bar{x}$)	Standard- abweichg. (s_x)	Vergleich mit	p
Normal	10	0,42	0,09	CML CLL Akut	< 0,0125 < 0,0005 < 0,40
CML	10	0,35	0,04	Norm CLL Akut	< 0,0125 < 0,0005 < 0,10
CLL	13	0,22	0,05	Norm CML Akut	< 0,0005 < 0,0005 < 0,0005
Akut	5	0,40	0,09	Norm CML CLL	< 0,40 < 0,10 < 0,0005

Tab. 5 : Esterfettsäuren in Leukozyten von Normalpersonen, chronischen myeloischen Leukämien, chronischen lymphatischen Leukämien und akuten Leukämien, angegeben in $\text{mg}/10^9$ Zellen.

Typ	Zahl d. Pat. (n)	Mittelwert ($\bar{x}$)	Standard- abweichg. (s_x)	Vergleich mit	p
Normal	11	6,48	1,40	CML CLL Akut	< 0,05 < 0,0005 < 0,20
CML	4	4,63	1,91	Norm CLL Akut	< 0,05 < 0,10 < 0,10
CLL	6	2,85	1,22	Norm CML Akut	< 0,0005 < 0,10 < 0,0025
Akut	5	7,40	2,72	Norm CML CLL	< 0,20 < 0,10 < 0,0025

2. Selektive cytochemische Lipidbestimmung

Die nachfolgende tabellarische Zusammenstellung (Tab. 6) zeigt das färberische Verhalten normaler und leukämischer Leukozyten bei der Färbung mit Sudanschwarz B . Je nach Farbtintensität und Anzahl der Lipidgranula wurden die Zellen den Stufen 0 bis 4 zugeordnet.

Zu näheren Charakterisierung der Hämoblastosen geben wir den Mittelwert der peripheren Leukozytenzahlen und die Prozentzahlen der reifzelligen und unreifzelligen Granulozyten sowie der Lymphozyten im Leukozytenkonzentrat an. Die durchschnittliche periphere Leukozytenzahl lag bei den chronischen Lymphadenosen bei 67 500, die Lymphozyten betrugen zwischen 83 und 98% der Gesamtleukozyten, den Rest bildeten reifzellige Granulozyten und Monozyten. Bei den chronischen Myelosen lag die periphere Leukozytenzahl bei 102 570, davon waren 33 % unreifzellige Granulozyten (Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten), 65 % reifzellige Granulozyten (Metamyelozyten, Stabkernige und Segmentkernige) sowie 2 % Lymphozyten.

Stabkernige sowie reife Granulozyten (neutrophile, eosinophile sowie basophile Segmentkernige) zeigten eine sehr gute Anfärbbarkeit des Cytoplasmas mit Sudanschwarz B. (Stufe 4). Es bestand insbesondere kein Unterschied zwischen Stabkernigen und Segmentkernigen bei Normalpersonen und bei chronischen Myelosen, auch die in spärlicher

Zahl auftretender reifen Granulozyten bei Lymphadenosen zeigten dasselbe färberische Verhalten. Den Vergleich zwischen Myeloblasten, Promyelozyten und Myelozyten von Normalpersonen und myeloischen Leukämien konnten wir nicht durchführen, da wir keine Knochenmarksausstriche, sondern nur Ausstriche von peripherem Blut auswerteten.

Myeloblasten bei chronischen myeloischen Leukämien ließen sich deutlich anfärben; teils zeigten sie eine grau-schwarze, feine " staubige " Granulierung in einzelnen Gruppen von Lipidgranula, teils enthielten sie gleichmäßig über das Cytoplasma verstreute, gröbere Lipidgranula. (Stufe 2-3)
Es konnte kein Unterschied zwischen einzelnen Patienten gefunden werden, insbesondere sahen wir keine Verminderung des Fettgehaltes in einzelnen Zellen innerhalb eines Ausstriches.

Promyelozyten und Myelozyten bei chronischen myeloischen Leukämien ließen sich durchweg gut anfärben, die einzelnen Granula waren gegenüber denen der Myeloblasten intensiver gefärbt und etwas gröber. (Stufe 3)

Die Zellen der myeloischen Reihe weisen nach diesen Ergebnissen eine dem Reifegrad der Zellen entsprechende , stetig zunehmende Farbtintensität auf.

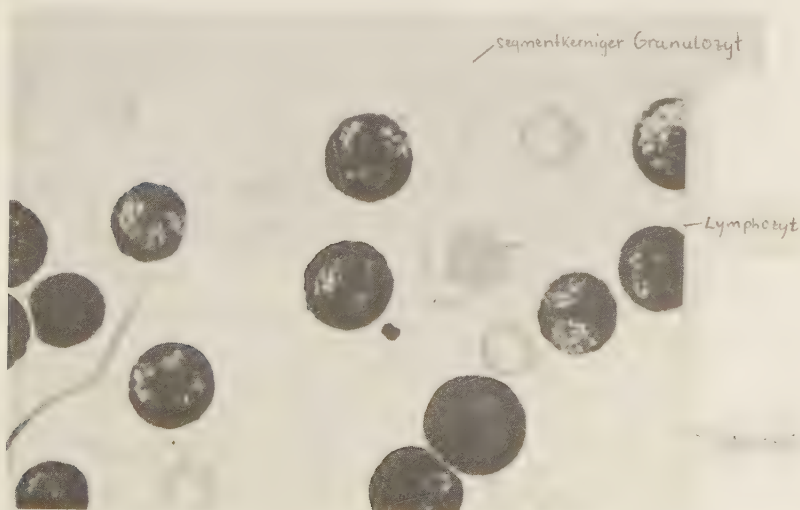
Lymphozyten zeigten bei Normalpersonen, chronischen myeloischen sowie chronischen lymphatischen Leukämien ein nahezu vollständig negatives färberisches Verhalten auf. Es bestand insbesondere kein Unterschied in der Sudanfärbbar-

keit normaler Lymphozyten und denen bei chronischen lymphatischen Leukämien. Nur ca. 0,5 % aller drei Kollektive ließ etwa 5 - 10 Lipidgranula (Stufe 0 - 1) erkennen. Auch hier bestanden keine Unterschiede zwischen einzelnen Patienten.

Monozyten wiesen bei Normalpersonen, chronischen Myelosen und bei chronischen Lymphadenosen keine Unterschiede in der Sudanfärbbarkeit auf. Sie färbten sich nur schwach an, das Cytoplasma enthielt spärliche Gruppen von Lipidgranula, die häufig in kleinen Gruppen saumförmig um den Kern lagen.
(Stufe 2)

Erythrozyten enthielten bei allen untersuchten Ausstrichen keine sudanpositiven Substanzen.

Abbildung 1 : Ausschnitt aus einem mit Sudanschwarz B gefärbtem Ausstrich eines Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie.



3. Lipidbestimmung in den Erythrozyten

Bei den Kontrollbestimmungen in den Erythrozyten ergaben sich bei 20 Fällen folgende Werte:

Gesamtlipide	0,48 mg/10 ⁹ Zellen (s= 0,071)
Lipidphosphor	0,01 mg/10 ⁹ Zellen (s= 0,002)
Freies Cholesterin	0,13 mg/10 ⁹ Zellen (s= 0,021)
Gesamtcholesterin	0,14 mg/10 ⁹ Zellen (s= 0,025)
Esterfettsäuren	0,22 mg/10 ⁹ Zellen (s= 0,036)

4. Gesamtlipidgehalt im Serum

Die Bestimmung der Gesamtlipide im Serum, die bei jedem Patienten gleichzeitig zur Leukozytenlipidbestimmung durchgeführt wurde, ergab keine wesentlichen Abweichungen von den Normalwerten. Die erhaltenen Werte lagen zwischen 490 und 800mg%; eine Ausnahme bildete ein Wert von 1180 mg% bei einem Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie.

Es bestand kein Zusammenhang zwischen der Höhe der Gesamtlipide im Serum und dem Lipidgehalt der Leukozyten bei den untersuchten Hämoblastosen.

	Zahl d. Fälle	Stab- kernige	Segmentker- nige	Myelo- blasten	Promye- lozyten	Myelo- zyten	Lympho- zyten	Mono- zyten
Normalpersonen	10	4	4	--	--	--	0-1	2
Chron. lymph. Leukämie	10	4	4	--	--	--	0-1	2
Chron. myeloi- sche Leukämie	4	4	4	2-3	3	3	0-1	2

Tab. 6 : Färberisches Verhalten normaler und leukämischer Leukozyten bei der Färbung mit Sudanschwartz B. Je nach Farbintensität und Anzahl der Lipidgranula Zuordnung zu den Stufen 0-4.

V. Diskussion

1. Methodik

In Vorversuchen wurden vergleichende Leukozytenlipiduntersuchungen durchgeführt, um zu ermitteln, inwieweit die Verarbeitung und Aufbewahrung bei verschiedenen Temperaturen den Leukozytenlipidgehalt beeinflussen. In den Ergebnissen konnten wir keinen eindeutigen Unterschied zwischen der Verarbeitung bei Temperaturen von $6-10^{\circ}\text{C}$ und bei Zimmertemperatur feststellen. Auch bei 10-stündiger Aufbewahrung einer Leukozyten-Plasma-Suspension bei $6-10^{\circ}\text{C}$ war kein Lipidverlust zu verzeichnen. Trotzdem wurden bei der Leukozytenverarbeitung Temperaturen von $6-10^{\circ}\text{C}$ bis zur Beendigung des Waschvorganges eingehalten, um die Stoffwechselvorgänge zu bremsen und damit einen Lipidaustausch zwischen Leukozyten und Plasma zu verhindern bzw. zu verringern. Um die Haltbarkeit des aus dem Leukozytenkonzentrat hergestellten Lipidextraktes zu prüfen, führten wir tägliche Kontrollbestimmungen der einzelnen Lipidfraktionen durch. Dabei ergab sich, daß der Lipidgehalt im Extrakt nach einer Woche dem sofort bestimmten gegenüber unverändert war.

Zur Trennung der isolierten Leukozyten vom lipidhaltigen Plasma mußte ein zweimaliger Waschvorgang mit physiologischer Kochsalzlösung vorgenommen werden.

Die Intaktheit der isolierten Zellen wurde morphologisch an Ausstrichen der gewaschenen Leukozytensuspension, die nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt wurden, geprüft.

Eine Kontamination durch Thrombozyten konnte bereits durch die Isolierungsmethode verhindert werden, da in der Leukozytenschicht keine Thrombozyten vorhanden sind. Da sich in dieser jedoch von Fall zu Fall wechselnde Anteile von mitsuspendierten Erythrozyten befanden, mußte der Erythrozytenfehler ausgeschlossen werden. Dieser wurde aus dem Gesamtlipidgehalt der Erythrozyten und der nach der Leukozytenisolierung im Konzentrat bestimmten Erythrozytenzahl berechnet und von dem Gesamtlipidgehalt des Leukozytenkonzentrates- bzw. Extraktes subtrahiert. Bezogen auf den Verunreinigungsgrad der Leukozyten durch Erythrozyten konnte dieser Fehler jedoch vernachlässigt werden. So ergab sich z. B. bei den Gesamtlipiden ein Korrekturfaktor von $0,08 \text{ mg}/10^9$ Zellen, der bei einem Leukozytengesamtlipidmittelwert von $15,56 \text{ mg}/10^9$ Zellen nicht ins Gewicht fällt. Entsprechendes gilt für die anderen Lipidfraktionen.

2. Ergebnisse

Unsere Untersuchungen über die quantitative Lipidzusammensetzung normaler und leukämischer Leukozyten haben ergeben, daß die Gesamtlipidwerte bei den chronischen lymphatischen Leukämien signifikant niedriger liegen als bei Normalpersonen und myeloischen Leukämien; diese Befunde stimmen mit den Angaben in der Literatur (CLINE¹¹, ALEKSANDROWICZ¹, BOYD⁶ und GOTTFRIED¹⁷) überein. Im Gegensatz zu BOYD²⁰ kommen wir mit GOTTFRIED¹⁷ zu dem Ergebnis, daß die Lipidkonzentration in normalen Leukozyten höher ist als in myeloischen Leukozyten.

Ein direkter Vergleich der von uns für die einzelnen Lipidfraktionen gefundenen Absolutwerte ist wegen der unterschiedlichen Bezugsgrößen nur mit den von GOTTFRIED¹⁷ mitgeteilten Ergebnissen möglich. Trotz Verwendung unterschiedlicher Isolierungs- und Bestimmungsmethoden besteht zwischen den von GOTTFRIED¹⁷ und uns erhobenen Befunden eine gute Übereinstimmung in den Angaben über Gesamtlipide in normalen Leukozyten, in chronisch lymphatischen Leukämiezellen und bei akuten myeloischen Leukämien. Das Gleiche gilt bei den Erythrozyten für die Gesamtlipide, den Lipidphosphor und das Cholesterin. Abweichungen zeigten sich bei Lipidphosphor und freiem Cholesterin in leukämischen und normalen Leukozyten. Unsere cytochemischen

Befunde bei Normalpersonen stimmen weitgehend mit den Angaben in der Literatur überein (WISLOCKI - DEMPSEY ³⁸, BAILLIFF - KIMBROUGH ², STORTI - PERUGINI ³⁷, POLLI - RATTI ³⁰, BLOOM - WISLOCKI ⁴, HAYHOE ¹⁸, HERTL ¹⁹ und LAMBERS - EGGSTEIN ²⁴).

Eine Verminderung des Fettgehaltes in Zellen der myeloischen Reihe bei chronischen Myelosen, wie sie STORTI - PERUGINI ³⁷ und LAMBERS - EGGSTEIN ²⁴ beschrieben, konnten wir nicht beobachten. Dagegen stehen unsere Beobachtungen, daß sich normale und leukämische Lymphozyten im färberischen Verhalten mit Sudanschwarz B nicht unterscheiden, in guter Übereinstimmung mit den Befunden von HAYHOE ¹⁸ und STORTI - PERUGINI ³⁷ .

Beim Vergleich der quantitativen Analysen mit den cytochemischen Untersuchungen ergab sich eine teilweise Parallelität der Befunde. Übereinstimmend bei beiden Untersuchungen war der Lipidgehalt der Leukozyten bei chronischen myeloischen Leukämien niedriger als bei Normalpersonen. Der Lipidgehalt in Leukozyten bei lymphatischen Leukämien, bei denen das Differentialblutbild zwischen 83 und 98 % Lymphozyten aufwies, betrug jedoch bei der quantitativen Bestimmung ca. 1/3 des Lipidgehaltes normaler Leukozyten, während bei der cytochemischen Untersuchung praktisch keine Lipide feststellbar waren.

Diese Diskrepanz zwischen cytochemischen und quantitativen Befunden könnte dadurch erklärbar sein, daß die Lipide in den Lymphozyten als sogenannte " maskierte " Lipide (CLARA ¹⁰) erscheinen. Danach können diese in solcher feiner Verteilung vorhanden sein, daß sie sich dem optischen und färbereischen Nachweis entziehen.

Im gesunden Herzmuskel, in Leber und Niere können beispielsweise Lipide bis zu 20 % der Trockensubstanz morphologisch unsichtbar, d. h. mit den üblichen Färbemethoden nicht nachweisbar sein. Die Schwankungen in der Menge der sichtbaren Lipide sind nach Ansicht von CLARA und DEBUCH ¹⁰ möglicherweise nur z. T. Ausdruck wirklicher mengenmäßiger Unterschiede, zu einem nicht geringen Teil spiegeln sie lediglich ein wechselndes Verhältnis zwischen freien und an Strukturglieder nichtlipider Art (z. B. Proteine) gebundenen Lipiden wieder. Diese gebundenen Lipide können durch die normale Sudanschwarz B -Färbung nicht sichtbar gemacht werden.

Die Annahme, daß der niedrige Leukozytenlipidgehalt bei chronischen Lymphadenosen für eine maligne Entartung der Zellen spricht, scheint nicht berechtigt zu sein. Bei den Lymphadenosen liegt der Lymphozytenanteil im Differentialblutbild sehr hoch (83 - 98 %) . Die Größe der Lymphozyten ist im Gegensatz zu Granulozyten und

Myeloblasten erheblich geringer. Berücksichtigt man nun noch das Verhältnis vom Kern zum Cytoplasma, so zeigt sich, daß der Kern bei den Granulozyten nur etwa $1/4$ des Zellvolumens ausmacht, während er bei normalen und leukämischen Lymphozyten etwa $4/5$ des Zellvolumens beträgt.

Würde man als Bezugsgröße nicht die Zellzahl, sondern den Proteingehalt der Leukozyten bzw. das aus ihm errechnete Frischgewicht zugrundelegen (1g Frischgewicht entsprechen nach den Untersuchungen von LÖHR ²⁶ $1,6 \times 10^9$ Granulozyten und 4×10^9 Lymphozyten), so zeigt sich, daß die für die lymphatische Leukämie als typisch angesehene Verminderung der Leukozytenlipide nur eine scheinbare sein könnte.

Diese Vermutung könnte nur durch getrennte Isolierung und Untersuchung von normalen und leukämischen Lymphozyten bestätigt werden. GOTTFRIED ¹⁷ hat diese Untersuchungen durchgeführt. Dabei ergab sich, daß die normalen Lymphozyten einen etwa doppelt so hohen Lipidgehalt besaßen wie die Lymphozyten bei chronischen Lymphadenosen. Allerdings sind nach Angaben von GOTTFRIED diese Werte wegen sehr geringer Fallzahl nicht repräsentativ. Auch BOYD ⁸ vermutete, daß der niedrige Leukozytenlipidgehalt bei chronischen Lymphadenosen nicht für eine maligne Entartung spreche. YASUDA und BLOOR ³⁹ stellten in Zellen

maligner Gewebe erhöhte Phospholipide, Cholesterine und Neutralfette fest. GERSTL, HAYMAN et al. ¹⁶ berichteten über erhöhte Gesamtlipide und erhöhte ungesättigte Fettsäuren in Zellen eines Lungencarcinoms. Besonders hoch waren die ungesättigten Fettsäuren beim " oat cell " Karzinom; erhöhte Phospholipide fanden sie in Zellen eines Lymphosarkoms.

Ausblick

Möglicherweise kann das Verhalten der Leukozytenlipide bei Hämoblastosen unter cytostatischer Therapie weitere Hinweise zur Erforschung des Lipidstoffwechsels (z. B. Normalisierung pathologischer Leukozytenlipidwerte) geben.

VI. Zusammenfassung

In vorliegender Arbeit wurden die Lipidwerte isolierter Leukozyten (Gesamtlipide, veresterte Fettsäuren, Lipidphosphoe, freies Cholesterin und Gesamtcholesterin) bei 11 Normalpersonen, 14 Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie, 10 Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie und 5 Patienten mit akuter Myeloblastenleukämie mit Mikrolitermethoden und einer neuen Isolierungstechnik quantitativ bestimmt und miteinander verglichen.

Bei 4 Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie und bei 10 Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie wurde simultan zur quantitativen Bestimmung der Lipidgehalt durch selektive cytochemische Untersuchung nach der Methode von SHEEHAN³⁴ bestimmt.

Bei den Gesamtlipiden und den veresterten Fettsäuren fand sich ein Verhältnis von 1 : 2 : 3 entsprechend chronische Lymphadenose : chronische Myelose : Normalpersonen.

Bei der cytochemischen Untersuchung wiesen die Zellen der myeloischen Reihe bei chronischen Myelosen eine dem Reifegrad der Zellen entsprechende, stetig zunehmende Farbinintensität auf. Lymphozyten zeigten bei Normalpersonen, chronischen myeloischen und chronischen lymphatischen Leukämien ein nahezu vollständig negatives färberisches Verhalten.

Eine Abhängigkeit des Serumlipidgehalts vom Leukozytenlipidgehalt konnte nicht festgestellt werden. Die Serumlipide der untersuchten Normalpersonen und Patienten mit Hämoblastosen lagen - mit einer Ausnahme - im Normbereich.

Übereinstimmend bei der cytochemischen Bestimmung und der quantitativen Untersuchung war der Lipidgehalt der Leukozyten bei chronischen myeloischen Leukämien niedriger als bei Normalpersonen.

Der Lipidgehalt in leukämischen Lymphozyten betrug jedoch ca. $\frac{1}{3}$ des Lipidgehalts normaler Lymphozyten - quantitativ bestimmt - , während bei der cytochemischen Untersuchung praktisch keine Lipide feststellbar waren.

Ursachen für diese Diskrepanzen werden diskutiert.

VII. Literaturangaben

1. ALEKSANDROWICZ, J., H. GAERTNER and J. URBANCZYK :
Metabolism of blood cells and their precursors.
Nuclear hematology (ed. E. Szirmai) p. 194
New York and London, Academic Press (1965)
2. BAILIFF, R.N., KIMBROUGH, C. :
Studies on leucocyte granules after staining
with sudan black B and May-Grunwald-Giemsa.
J. Lab. & Clin. Med. 32 : 155, (1947)
3. BESSIS, M.: Die Zelle im Elektronenmikroskop.
Sandoz - Monographie (1960), S.26
4. BLOOM, M.L., WISLOCKI, G.B.: The localization of lipids
in human blood and bone marrow cells.
Bloos 5 : 79 (1950)
5. BOYD, E.M.: The lipid content of the white blood cells
in normal young women.
J. Biol. Chem. 101 : 623 (1933)
6. BOYD, E.M.: The lipid composition of the white blood
cells in leukemia.
Arch. Patholog. 21 : 739 (1936)
7. BOYD, E.M., STEPHENS, D.J.: A comparison of lipid com-
position with differential count of the white
blood cells.
Proc. Soc. f. Exp. Biol. and Med. 33 : 558 (1936)
8. BOYD, E.M., WILSON, K.M.: The exchange of lipids in the
umbilical circulation at birth.
J. CLin. Invest. 14 : 7 (1935)
9. BUCHANAN, A.A. et al. :Lipid synthesis by human leuco-
cytes in vitro.
The Biochem. J. 75 : 315 (1960)
10. CLARA, M., DEBUCH, H.: Handbuch der Histochemie, BandIV/1
Gustav-Fischer Verlag Stuttgart (1965)

11. CLINE, M.J.: Metabolism of the circulating leucocyte.
Physiolog. Rev. 45 : 675 (1965)
12. EGGSTEIN, M.: Die Neutralfettberechnung für Blutserum
als Differenz aus Fettsäureesterwert und Lipid-
fettsäuren.
Klin. Wschr. 43 : 1031 (1965)
13. EHRHART, H., DÖRFLER, E.: Untersuchungen über den Leuko-
zytenstoffwechsel. I. Mitteilung. Eine neue
Methode zur Isolierung von vitalen Leukozyten.
Blut 10 : 231 (1964)
14. ELSBACH, P.: Composition and synthesis of lipids in
resting and phagocytizing leucocytes.
J.Exp. Med. 110 : 969 (1959)
15. FISKE, C.H., SUBARROW, J. : The colorimetric determina-
tion of phosphorus.
J.Biol. Chem. 66 : 375 (1925)
16. GERSTL, B., HAYMAN, R.B., RAMORINO, B.S.P., TAVASTSTJERNA,
M.G., SMITH, J.K.: Lipids of malignant tumors.
J. Clin. Path. 43 : 314 (1965)
17. GOTTFRIED, E.L.: Lipids of human leucocytes : relation
to cell type.
J. Lipid Res. 8 : 321 (1967)
18. HAYHOE, F.G.J.: Cytochemical demonstration of lipids in
blood and bone marrow cells.
J. Path. and Bact. 65 : 421 (1953)
19. HERTL, M.: Zytochemische Untersuchungen an Lymphozyten
und Monozyten des strömenden Blutes.
Ärztliche Forschung 14 : I/40 (1960)
20. KATSURA, S., HATAKEYAMA, T. u. TAJAMA, K.: Eine titri-
metrische Bestimmungsmethode für kleine Men-
gen Phosphatide, freies Cholesterin, Cholesterin-
ester, Neutralfette und Gesamtphosphatide des
Blutes sowie des Blutplasmas.
Biochem. Z. 269 : 231 (1934)

21. KIDSON, C.: Leucocyte lipid metabolism in myeloproliferative states.
Austr. Ann. Med, 11 : 50 (1962)
22. KIDSON, C.: Lipid synthesis in human leucocytes in acute leukemia.
Austr. Ann. Med. 10 : 282 (1961)
23. KIDSON, C.: Relation of leucocyte lipid metabolism to cell age: studies in infective leucocytosis.
Brit. J. of Exp. Path. 42 : 597 (1961)
24. LAMBERS, K., EGGSTEIN, M.: Der Fettgehalt der Granulozyten und ihrer Vorstufen unter normalen und pathologischen Bedingungen.
Verh. d. dt. Ges. f. Inn. Med. 65 : 191 (1959)
25. LISON, L.: Sur des nouveaux colorants histologiques spécifiques des lipides.
C.R.Soc. Biol. 115 : 202-205 (1934)
26. LÖHR, G.W.: Stoffwechseleigenschaften und Enzyme der Leukozyten des Menschen.
Folia haematolog. , Neue Folge, 6 : 49-72 (1961)
27. LÖHR, G.W., WALLER, H.D.: Enzymverteilungsmuster und Energiestoffwechsel normaler und leukämischer weißer Blutzellen des Menschen.
Dtsch. med. Wschr., Bd. 89/4 171 (1964)
28. MALAMOS, B., MIRAS, C., LEVIS, G., MANTZOS, J.: The in vitro incorporation of acetate- $14C$ into normal and leukemic leucocyte lipids.
J.Lipid Res. 3 : 222 (1962)
29. MARKS, P.A., GELLHORN, A., KIDSON, C.: Lipid synthesis in human leucocytes, platelets and erythrocytes.
J. Biol. Chem. 235 : 2579 (1960)
30. POLLI, E., RATTI, G.: Studien über Leukozyten I. Die Lipidfraktionen in intakten Zellen und in isolierten Zellkernen bei normalen und patholog. Zuständen.
Biochem. Zschr. 332 : 546 (1953)

31. RABINOWITZ, Y.: Blood 23 : 811 (1964)
32. RAPAPORT, S.M.: Medizinische Biochemie.
Berlin 1966, S. 164 u. 638
33. ROWE, C.E., ALLISON, A.C., LOVELOCK, J.E.: Synthesis
of lipids by different human blood cell types.
Biochem. et Biophys. Acta 41 : 310 (1960)
34. SHEEHAN, H.L.: The staining of leucocyte granules by
sudan black B.
J. Path. and Bact. 49 : 580 (1939)
35. SHEEHAN, H.L., STOREY, G.W.: An improved method of
staining granules with sudan black B.
J. Path. and Bact. 59 : 336 (1947)
36. SPERRY, W.M., WEBB, M.: A revision of the Schoenheimer-
Sperry - method for cholesterol determination.
J. Biol. Chem. 197 : 97 (1950)
37. STORTI, E., PERUGINI, S.: Cytochemical researches on
the lipids of the hematic cells with particular
attention to those of acute leucosis.
Act. haematol. , Vol. 5/6 : 321 (1951)
38. WISLOCKI, G.B., DEMPSEY, E.W.: Observations on the chemi-
cal cytology of the normal blood and hemopoietic
tissues.
Anat. Rec. 96 : 249 (1946)
39. YASUDA, M., BLOOR, W.R.: J. Clin. Invest. 11 : 677 (1932)
40. ZÖLLNER, N., KIRSCH, K.: Über die quantitative Bestimmung
von Lipoiden (Mikromethoden) mittels der
vielen natürlichen Lipide (allen bekannten
Phospholipiden) gemeinsamen Sulfophosphovanillin-
Reaktion.
Z. ges. exp. Med. 135 : 545 (1962)

Herrn Professor Dr. Schwiegk möchte ich für die Erlaubnis danken, an den Patienten seiner Klinik diese Untersuchungen durchzuführen.

Herrn Priv.-Dozent Dr. Schwandt bin ich für die Überlassung des Themas, für die Ratschläge und Leitung beim Entstehen dieser Arbeit zu besonderem Dank verpflichtet.

Herrn Professor Dr. Ehrhart möchte ich für die zahlreichen Anregungen und die Unterstützung bei wesentlichen Untersuchungen, die ich in seinem Labor durchführen durfte, danken.

L e b e n s l a u f

Am 8.10. 1941 wurde ich als Tochter des Kaufmannes Alfons Linke und seiner Ehefrau Rosa in Görlitz / Oberschlesien geboren. Meine Kindheit verbrachte ich in Neunkirchen a. S. /Nürnberg, Neckarsulm und Bad Mergentheim / Baden-Württemberg. Von 1951 bis 1960 besuchte ich das Gymnasium in Neckarsulm und das Humanistische Gymnasium in Bad Mergentheim. 1960 Abitur in Bad Mergentheim. Vorklinisches und klinisches Studium in München.

Medizinisches Staatsexamen in München im Juli 1967.

Im Oktober 1967 Eheschließung mit dem Arzt Christian Morell.

Vom 1.11. 1967 - 31.5.1968 arbeitete ich als Medizinalassistentin an der I. Medizinischen Universitätsklinik München, vom 1.8.1968 - 28.2.1969 Medizinalassistentin am Klinisch-Chemischen Institut der Technischen Hochschule (Klinikum r.d.Isar) München.

Chirurgische und gynäkologische Medizinalassistentenzeit im Krankenhaus Bethesda in Freudenberg/ Westf.

Im Oktober 1969 Geburt einer Tochter. Die Approbation erhielt ich zum 1.1.1970. Seitdem befinde ich mich in der Ausbildung zum Facharzt für Allgemeinmedizin im Krankenhaus Bethesda in Freudenberg.

